WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

C12P 19/04, 39/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 00/08201

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

17. Februar 2000 (17.02.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/05681

(22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1999 (05.08.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 35 767.2

7. August 1998 (07.08.98)

DE

(71)(72) Annielder und Erfinder: KULICKE, Werner-Michael [DE/DE]; Schachblumenweg 12, D-22523 Hamburg (DE).

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KATH, Franziskus, Karl, Thomas [DE/DE]; Wrangelstrasse 90, D-20253 Hamburg (DE).
- (74) Anwalt: SCHMIDT-BOGATZKY, Jürgen; Lüneburger Tor 4, D-21073 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, Fl, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING HIGH-MOLECULAR BIOLOGICALLY ACTIVE IMMUNOMODULATING POLYSACCHA-RIDES FROM SACCHAROMYCES CEREVISIAE YEAST

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG HOCHMOLEKULARER BIOLOGISCH AKTIVER IMMUNMODULIEREN-DER POLYSACCHARIDE AUS HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

(57) Abstract

The invention relates to a method for obtaining high molecular biologically active immumodulating polysaccharide from Saccharomyces cerevisiae yeast. In a first step, the yeast cells are mechanically disintegrated under the effect of shear forces in such a way that the cell walls are separated from the inner part of the cell. In a second step, the cell wall material obtained is purified and dried. The cell wall material is then subjected to enzymatic digestion in a third step and the aqueous insoluble glucan thus formed is obtained as a solid by centrifugation and the aqueous soluble mannan is obtained in the supernatant. Said method makes it possible to obtain high yields of glucan and mannan with intact native structure.

(57) Zusamnienfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe Saccharomyces Cerevisiae. In einer ersten Verfahrensstufe werden die Hefezellen durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch soweit zerrissen, daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt sind. Die Zellwandbestandteile werden von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt. In einer zweiten Verfahrensstufe wird dann das gewonnene Zellwandmaterial gereinigt und getrocknet. Danach wird das Zellwandmaterial in einer dritten Verfahrensstufe einem enzymatischen Aufschluß unterzogen und das hierbei entstehende wasserunlösliche Glucan durch Zentrifugation als Feststoff und das wasserlösliche Mannan im Überstand gewonnen. Durch dieses Verfahren erfolgt eine hohe Ausbeute von Glucan und Mannan mit intakter nativer Struktur.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

ΑL	Albanien	ES	Spanien	I.S	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenica	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AΤ	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΛU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
۸7.	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Мопасо	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	[sland	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IТ	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
ÇII	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	Yυ	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
cz	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		•
DE	Deutschland	Li	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	\$G	Singapur		

Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe Saccharomyces Cerevisiae

⊋ .

1

10

15

20

25

30

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe Saccharomyces Cerevisiae. 5

Die Bedeutung des Immunsystems zur Abwehr von Krankheiten in menschlichen und tierischen Organismen ist bekannt. Es ist ferner allgemein bekannt, daß es in der Zellwand von Hefe Polysaccharide gibt, die in tierischen und menschlichen Organismen immunstimulierend wirken und zur Abweher von Krankheiten eingesetzt werden können. Diese Polysaccharide sind Mannan und Glucan. Das Mannan, bestehend aus 1,2-, 1,3und 1,6-α-glykosidisch verknüpften Mannose-Einheiten, ist an eine Protein-Matrix gebunden und sitzt auf der äußeren Zellwand der Hefezelle, während das Glucan 1,3-βglykosidisch verknüpft ist mit wenigen 1,6-β-glykosidischen Seitenketten und sich in der inneren Zellwand befindet. Zur Isolierung dieser beiden Polysaccharide wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, bei denen durch Einwirkung von Säuren und Laugen die beiden Zellwandkomponenten getrennt werden. Bei diesen herkömmlichen Verfahren sind jedoch viele Verfahrensschritte erforderlich und darüber hinaus wird die native Struktur der Zellwand-Polysaccharide beschädigt, so daß die immunabwehrfördernden Effekte beeinträchtigt werden.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, das Verfahren der eingangs genannten Art so zu gestalten, daß bei einer Verminderung der erforderlichen Verfahrensschritte ein optimaler immunmodulierender Effekt erzielt wird.

Erfindungsgemäß erfolgt die Lösung der Aufgabe durch die Merkmale des Anspruchs 1. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung werden in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

Nach der Erfindung wird gegenüber den herkömmlichen sauren und alkalischen Extraktionen bei der Isolierung der Polysaccharide eine Degradation vermieden, da durch den Einsatz von Enzymen extreme pH-Werte vermieden werden. Außerdem wird die Anzahl der erforderlichen Verfahrensschritte deutlich reduziert. Gemäß der Erfindung werden zunächst über einen mechanischen Zellaufschluß die Zellwände vom Zellinneren abgetrennt und die erhaltenen Zellwandabschnitte gereinigt und getrocknet. 35 Vorteilhaft ist eine Gefriertrocknung. Es ist aber auch die Anwendung anderer Gefrierverfahren möglich. Dann erfolgt eine Einwirkung von technischen

PCT/EP99/05681

1

5

10

15

20

Enzymen auf die isolierten Zellwandabschnitte der Hefe Saccharomyces Cerevisiae, wodurch die Substanzen rein isoliert werden können. Man erhält sowohl Mannan als auch Glucan, welche direkt für immunstimulierende Zwecke z.B. in Hautcremes eingesetzt werden können. Da das Glucan in Wasser unlöslich ist, kann es durch chemische Umsetzungen in wasserlösliche Derivate überführt werden. Hierzu sind zahlreiche Derivatisierungsmethoden bekannt. Es können spezielle Mannan-Komponenten isoliert werden, die Molmassen im Bereich von 20.000 bis 400.000 g/mol haben, eine spezifische, immunmodulierende Reaktion zeigen und dabei aber nicht cytotoxisch wirken. Diese Mannan-Komponenten können unter Umständen auch zur Bekämpfung von Asthma-Erkrankunen genutzt werden, da sie in in vitro Tests eine immunsuppressive Wirkung zeigten. Zur Isolierung der Polysaccharide können vorteilhaft kommerzielle Enzyme eingesetzt werden, wie Protease (SIGMA-ALDRICH), Pronase (MERCK), beide aus Streptomyces griseus, Lyticase, auch Zymolyase genannt (SIGMA-ALDRICH), wie auch Enzymcocktails aus Helix pomatia und aus Cytophaga (MERCK). Es ist aber auch die Verwendung anderer geeigneter Enzyme oder Enzymcocktails möglich.

Der Vorteil der enzymatischen Isolierung von Hefeinhaltsstoffen besteht darin, daß Glucanderivate und Mannan bereits ohne Dosis-Wirkungsoptimierung wirksam sind und dies sogar im in vivo Test zur Überprüfung der Anti-Tumoraktivität. Ein Tumor wächst auch nach erneuter Inkubation nicht wieder an. Durch Anwendung der Glucanderivate und Mannan besteht auch keine Toxizität, bzw. nur eine geringe Toxizität.

Das nach der Erfindung gewonnene Mittel kann vielfältig angewandt werden.

Für die Wundheilung ist es möglich, das Mittel rein physikalisch als feuchtigkeitsspeichernde Abdeckung und bei offenen Wunden zur Aktivierung von Immunzellen zu verwenden. Ferner wirkt das Mittel gegen pathogene Bakterien und Viren. Außerdem hat das erfindungsgemäße Mittel eine regulierende Wirkung auf Autoimmunkrankheiten wie z.B. Asthma und Epilepsie.

30

35

Die Anwendung kann über Salben, Emulsionen, Gellösungen, durch Spritzen oder Mikroverkapselung, oral durch Pillen oder Lösungen oder intramuskulär z.B. durch Spritzen in die Bauchhöhle oder intravenös erfolgen, was ein höchstes Wirkungspotenzial hat. Der Einsatz des erfindungsgemäßen Mittels ist möglich bei HIV-Infektionen, Tumoren sowohl bei Menschen wie auch Tieren, Tuberkulose, akuter Sepsis, Bakterien, Pilze, gesteigerter Interferonproduktion, zur Steigerung der Leukozytenzahl, zur Wundheilung wie z.B. zum Schutz vor Strahlenschäden und

Infektionen und darüber hinaus zur Erhöhung der Transplantationsimmunität, zur Bekämpfung von Trauma, zur Erhöhung von Blutbildung und zur Impfunterstützung. Ferner ist ebenso eine umfangreiche Anwendung bei Tieren zur Immunförderung möglich.

5

1

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand der in der Zeichnung schematisch dargestellten Verfahrensabläufe näher erläutert.

Die Hefezellen 1 werden in der ersten Verfahrensstufe A durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch zerrissen, so daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt 10. werden. Hierzu wird ein Mahlbehälter 2 mit einer Suspension aus Hefezellen und Glasperlen gefüllt und in z.B. einer Schwingmühle 3 mit hoher Frequenz geschüttelt. Als Glasperlen werden vorzugsweise solche mit einem Durchmesser von 0,75 - 1,5 mm verwendet. Die Frequenz der Schwingmühle 3 beträgt z.B. 1600 s⁻¹. Das so gewonnene Zellwandmaterial 4 wird dann in einer weiteren Verfahrensstufe B durch Zentrifugation 15 gereinigt oder aber an mikroporösen Membranen durch Waschen gereinigt. Das so aufbereitete Zellwandmaterial 4 wird dann gefriergetrocknet. In der dann folgenden Verfahrensstufe C wird das Zellwandmaterial 4 einem enzymatischen Aufschluß unterzogen. Spezifische Enzyme wie Pronase oder Glucanase oder spezifische Enzymcocktails wie Zymolyase, Cytophaga, Helicase oder Cellulase zerstören in der 20 äußeren Zellwand des Zellwandmaterials 4 die Proteinmatrix und setzen lösliches Mannan 5 frei. Das unlösliche Glucan 6 wird durch Zentrifugation abgetrennt und gesondert aufbereitet. Das Mannan 5 kann durch Dialyse oder chromatographisch gereinigt werden.

25

30

35

Nachstehend werden zwei Ausführungsbeispiele der Erfindung beschrieben:

1. Ausführungsbeispiel

5,0 g Hefezellwände aus dem mechanischen Aufschluß wurden in 115 ml Trispuffer Lösung (Tri(hydroxymethyl)aminoethan, mit Salzsäure auf pH = 7,5 eingestellt) suspendiert und auf 37,0°C temperiert. 10,6 mg Pronase E (Streptomyces griseus, Fa. MERCK) wurden in 5 ml Puffer-Lösung gelöst und zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach sechs Stunden wurde der Feststoff abzentrifugiert und der Überstand dialysiert. Nach Gefriertrocknung erhielt man Mannan aus dem Überstand, während im Feststoff 2,9 g Glucan zu finden sind.

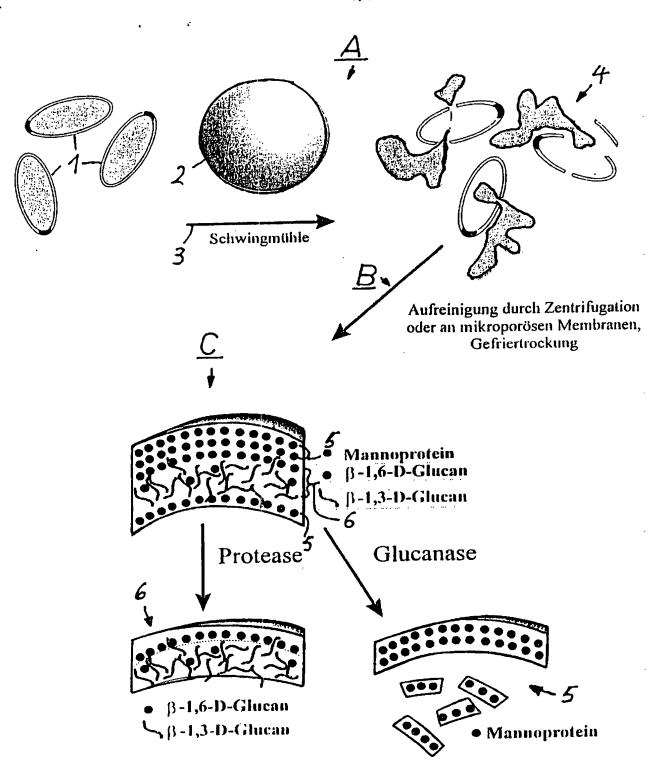
1 2. Ausführungsbeispiel

- 1,55 g Hefezellwände aus dem mechanischen Aufschluß wurden in 60 ml Trispuffer-Lösung (Tri(hydroxymethyl)aminoethan, mit Salzsäure auf pH = 7,5 eingestellt) suspendiert und auf 37,0°C temperiert. 462 mg Protease (Streptomyces griseus, Fa.
- SIGMA) wurden in 5 ml Puffer-Lösung gelöst und zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach 6,5 Stunden wurde der Feststoff abzentrifugiert und der Überstand dialysiert. Nach Gefriertrocknung erhielt man 352 mg Mannan aus dem Überstand, während im Feststoff 522 mg Glucan zu finden sind.
- Das gewonnene wasserunlösliche Glucan kann chemisch durch Carboxymethylirung, Phosphatierung, Sulfatierung, Sulfonierung, Glycosidierung oder dergleichen in eine lösliche Form gebracht werden. Bei dem gewonnenen wasserunlöslichen Glucan kann durch Einwirkung von Ultraschall die Löslichkeit und dadurch die Bioverfügbarkeit erhöht und für eine zu behandelnde Person unerwünschte Nebenwirkungen verhindert werden.
- Es ist auch möglich, das gewonnene wasserunlösliche Glucan sowohl chemisch, wie auch durch Ultraschall zu behandeln. Ferner ist es möglich, das gewonnene wasserunlösliche Glucan bei unterschiedlichen Temperaturen zu behandeln. Kurzzeitig kann das Autoklavieren des wasserunlöslichen Glucans bei Temperaturen bis 200 C erfolgen. Bei einer Zeit des Autoklavierens des wasserunlöslichen Glucans länger als 5 min kann dies bei Temperaturen bis 150 C erfolgen. Das wasserlösliche Glucan kann auch in einem Lösungsmittel DMSO einem Dehnströmvorgang unterworfen werden. Hierzu ist es möglich, daß das wasserlösliche Glucan durch eine Lochblende, eine poröse Kugelschüttung, eine Rollenmühle oder eine Einrichtung für eine Kapillarströmung geführt wird.

- Patentasprüche

 1. Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender 1 Polysaccharide aus Hefe Saccharomyces Cerevisiae, dadurch gekennzeichnet, daß in einer ersten Verfahrensstufe A die Hefezellen durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch soweit zerrissen werden, daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt sind und daß dann die Zellwandbestandteile von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt 5 werden, daß dann in einer zweiten Verfahrensstufe B das in der ersten Verfahrensstufe A gewonnene Zellwandmaterial gereinigt und getrocknet wird und daß dann das Zellwandmaterial in einer dritten Verfahrensstufe C einem enzymatischen Aufschluß unterzogen und das hierbei entstehende wasserunlösliche Glucan durch Zentrifugation als Feststoff und wasserlösliche Mannan im Überstand gewonnen wird. 10
 - 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das in der ersten Verfahrensstufe A gewonnene Zellwandmaterial gefriergetrocknet wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der ersten Verfahrensstufe A gewonnenen Zellwandbestandteile durch Zentrifugation von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt und vor der Gefriertrocknung gereinigt werden.
- 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der ersten Verfahrensstufe A gewonnenen Zellwandbestandteile an mikroporösen Membranen von 20 den Bestandteilen des Zellinneren getrennt und durch Waschen vor der Gefriertrocknung gereinigt werden.
- 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gefriergetrockneten Zellwandbestandteile in einem Puffersystems bei einem pH-Wert von 3,0 bis 11 bei 25 Temperaturen zwischen 20°C und 50°C über einen Zeitraum von vier bis 30 Stunden mit enzymatischen Aufschlußmitteln zur Reaktion gebracht werden.
- 6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel Proteasen aus Streptomyces griseus und/oder Lyticase (Zymolyase) 30 verwendet werden.

- 1 7 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel Enzymcocktails aus Helix pomatia und/oder aus Cytophaga verwendet werden.
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel ein Gemisch aus Enzymen und Enzymcocktails verwendet wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das gewonnene
 wasserunfösliche Glucan chemisch durch Carboxymethylirung, Phosphatierung,
 Sulfatierung, Sulfonierung, Glycosidierung oder dergleichen in eine lösliche Form gebracht wird.
- 10. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß bei dem gewonnenen
 15 wasserunlöslichen Glucan durch Einwirkung von Ultraschall die Löslichkeit erhöht und für eine zu behandelnde Person unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden.
 - 11. Verfahren nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß das gewonnene wasserunlösliche Glucan sowohl chemisch wie auch durch Ultraschall behandelt wird.
- Verfahren nach Anspruch 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das gewonnene wasserunlösliche Glucan bei unterschiedlichen Temperaturen behandelt wird.
- 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Autoklavieren des
 25 wasserunlöslichen Glucans kurzzeitig bei Temperaturen bis 200 C erfolgt.
 - Verfahren nach Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß das Autoklavieren des wasserunlöslichen Glucans länger als 5 min bei Temperaturen bis 150 C erfolgt.
- 30 15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserlösliche Glucan In einem Lösungsmittel DMSO einem Dehnströmungsvorgang unterworfen wird.
- 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserlösliche Glucan durch eine Lochblende, eine poröse Kugelschüttung, eine Rollenmühle oder eine
 35 Einrichtung für eine Kapillarströmung geführt wird.



Glucan und Mannan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Inal Application No PCT/EP 99/05681

A. CLASSIF IPC 7	C12P19/04 C12P39/00		
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classificati	on and IPC	
B. FIELDS	SEARCHED		
Minimum doc IPC 7	umentation searched (classification system followed by classification C12P	n symbols)	
	on searched other than minimum documentation to the extent that su		
Electronic da	ata base consulted during the international search (name of data base	e and, where practical, search terms used	
C. DOCUME	NTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	vant passages	Retevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 3 February 1975 (1975-02-03) Columbus, Ohio, US; abstract no. 28265, SITNIKOV, V. S. ET AL: "Cell wal Candida yeasts" XP002124912 abstract & GIDROLIZ. LESOKHIM. PROM-ST. (1 (6), 5-6,	ls of	1-16
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.
"A" docum consid "E" earlier filling "L" docum which citatic "O" docum other "P" docum	ent defining the general state of the lart which is not dered to be of particular relevance document but published on or after the international date ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another in or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed.	"T" later document published after the interest or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention. "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the description of particular relevance; the cannot be considered to involve an indocument is combined with one or manners, such combination being obvict in the art. "&" document member of the same patent.	the application but secry underlying the claimed invention it be considered to cournent is taken alone claimed invention inventive step when the ore other such docutives to a person skilled it family
7	December 1999	27/12/1999	
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Douschan, K	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter anal Application No PCT/EP 99/05681

	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	I Date of the second of the se
Category '	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 5, 5 August 1985 (1985-08-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 34603, SHIRAISHI, ATSUSHI ET AL: "Cell wall of Sporobolomyces red yeast" XP002124913 abstract & FUKUOKA JOSHI DAIGAKU KASEIGAKUBU KIYO (1985), 16, 47-54,	1-16
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199723 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1997-252948 XP002124914 & JP 09 084529 A (KOHJIN CO LTD), 31 March 1997 (1997-03-31) abstract	1-16
Y	DE 30 17 372 A (KIRIN BEER K.K.) 20 November 1980 (1980-11-20) the whole document	1-16
·		

MIRKIMITOTAL DEGICAL NELVICA

information on patent family members

Inter and Application No
PCT/EP 99/05681

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 9084529	Α	31-03-1997	NONE	
DE 3017372	A	20-11-1980	JP 1224274 C JP 55148097 A JP 58057153 B JP 1408832 C JP 55147224 A JP 62013929 B FR 2455893 A GB 2048918 A,B US 4313934 A	15-08-1984 18-11-1980 19-12-1983 24-11-1987 17-11-1980 30-03-1987 05-12-1980 17-12-1980 02-02-1982

Form PCT/ISA/210 (natent tamily annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENDERICHT

Inter onales Aktenzeichen PCT/EP 99/05681

C.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 5, 5. August 1985 (1985-08-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 34603, SHIRAISHI, ATSUSHI ET AL: "Cell wall of Sporobolomyces red yeast" XP002124913 Zusammenfassung & FUKUOKA JOSHI DAIGAKU KASEIGAKUBU KIYO (1985), 16, 47-54,	1-16
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199723 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1997-252948 XP002124914 & JP 09 084529 A (KOHJIN CO LTD), 31. März 1997 (1997-03-31) Zusammenfassung	1-16
Y	DE 30 17 372 A (KIRIN BEER K.K.) 20. November 1980 (1980-11-20) das ganze Dokument	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter phales Aktenzeichen PCT/EP 99/05681

			ALMODOFOENCE	NINCC
	VI ACCIE	ITIERIING DES ANI	MELDUNGSGEGENSTA	MUES
м.	VEW 2211	TELETIONS DES AIM		
		C12P19/04	C12P39/00	
	PK 7	C LOPIU/II/I	1 1 / 2 3 4 / 13 11	
	r / /	U 1 C 1 1 7 / U 9	012137700	

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

(ategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 5, 3. Februar 1975 (1975-02-03) Columbus, Ohio, US; abstract no. 28265, SITNIKOV, V. S. ET AL: "Cell walls of Candida yeasts" XP002124912 Zusammenfassung & GIDROLIZ. LESOKHIM. PROM-ST. (1974), (6), 5-6,	1-16

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie
Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	óder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erlindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden
"E" älteres Ookument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	Theorie angageben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erlindung
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritäteanspruch zweifelhaft er- scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kalegorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naholiegend ist "8" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patenttamilie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
7. Dezember 1999	27/12/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Douschan, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angauen zu Yarananillenungen, die zur selban Patentfamilie gehören

Interi Tales Aktenzeichen
PCT/EP 99/05681

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
JP 9084529	Α	31-03-1997	KEINE		
DE 3017372	A	20-11-1980	JP 1224274 C JP 55148097 A JP 58057153 B JP 1408832 C JP 55147224 A JP 62013929 B FR 2455893 A GB 2048918 A,B US 4313934 A	15-08-1984 18-11-1980 19-12-1983 24-11-1987 17-11-1980 30-03-1987 05-12-1980 17-12-1980 02-02-1982	